



TITLE:

前立腺腫瘍の組織化学的研究

AUTHOR(S):

杉山, 壽一

CITATION:

杉山, 壽一. 前立腺腫瘍の組織化学的研究. 泌尿器科紀要 1985, 31(1): 49-69

ISSUE DATE:

1985-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/118387>

RIGHT:

前立腺腫瘍の組織化学的研究

名古屋大学医学部泌尿器科学教室（主任：三矢英輔教授）

杉 山 壽 一*

THE HISTOCHEMISTRY OF COMPLEX CARBOHYDRATES
IN THE PROSTATIC TUMOR

Toshikazu SUGIYAMA

*From the Department of Urology, School of Medicine, Nagoya University**(Director: Prof. H. Mitsuya)*

Seventy five prostatic specimens from cancer, BPH and normal controls were studied by light microscopic histochemical methods for the demonstration of complex carbohydrates and some proteins: 1) alcian blue (AB) (pH 1.0), 2) alcian blue (AB) (pH 2.5), 3) Periodic Acid-Schiff (PAS), 4) peroxidase labelled-*Ricinus communis* agglutinin-diaminobenzidine (PO-RCA-DAB), 5) Concanavalin A-peroxidase-diaminobenzidine (ConA-PO-DAB), 6) ConA-PO-DAB-periodic acid-m-aminophenol Fast black salt K (ConA-PO-DAB-PA-AP-FBK).

For identifying individual acidic and neutral carbohydrates, following procedures of enzyme digestion were performed upon some tissue sections prior to the above histochemical staining: a) sialidase (prior to staining with AB at pH 2.5), b) streptomyces hyaluronidase (prior to staining with AB at pH 2.5), c) testicular hyaluronidase (prior to staining with AB at pH 1.0 or pH 2.5), d) chondroitinase ABC (prior to staining with AB at pH 1.0 or pH 2.5), e) chondroitinase AC (prior to staining with AB at pH 1.0 or pH 2.5), f) α -amylase (prior to staining with PAS).

In addition, the tissue specimens from prostatic cancer were stained immunohistochemically for demonstration of prostatic acid phosphatase (PAP) and the serum PAP levels were also measured by radioimmunoassay.

The histochemical differences in the prostatic tissue among normal control, BPH and cancer as follows.

In the tissue of prostatic cancer, chondroitin sulfate A, C and hyaluronic acid were present in the interstitium. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and sialic acid were present in the cytoplasm of cancer cells.

In the tissue of BPH chondroitin sulfate B and hyaluronic acid was present in the interstitium and hyaluronic acid was present in the cytoplasm of epithelial cells.

In the epithelial basement membrane of the tissue from BPH, chondroitin B and hyaluronic acid were present.

1,2-Glycol groups of neutral complex carbohydrates in the interstitium of prostatic cancer were shown to exist in smaller amounts than in that of BPH.

In the cytoplasm of cancer cells the intensity of both PO-RCA-DAB and ConA-PO-DAB staining could be divided into three groups: strong, moderate and weak.

In the prostatic cancer there was a good correlation between the intensity of PO-RCA-DAB

* 現：静岡済生会病院泌尿器科

staining and tumor grade, and intensity of ConA-PO-DAB staining was correlated well with serum PAP level.

The cytoplasm of cancer cells showed a positive reaction to PAP immunostaining and no appreciable difference was observed according to tumor grade.

These results indicate that the histochemical procedures might provide important information to diagnose prostatic cancer with more accuracy and evaluating management in more detail in comparison with the previous available histopathological methods.

Key words: Prostatic carcinoma, Histochemistry, Complex carbohydrates, Lectin, PAP

結 言

複合糖質は分子内に糖を共有結合でもつ生体高分子化合物であり、ムコ多糖、糖タンパク、糖脂質とに分類され¹⁾、その多彩な分布、機能などにより、近年注目を集めている。

糖タンパクは、広くすべての細胞に含まれ、またタンパクを合成するすべての細胞でつくられる。合成された糖タンパクは、一部は細胞膜の構成成分として、細胞内顆粒の限界膜や形質膜などすべての膜構造にふくまれ、またその一部は細胞外に分泌される。すなわち糖タンパクには、各種ホルモン、各種酵素、免疫グロブリン、血液型糖タンパクなど多数があり、生体にとってきわめて重要な物質である。さらに細胞組織の癌化にともなう間質との相互関係や、癌細胞膜と正常細胞膜との差異が、糖タンパクやムコ多糖の変化の面からも注目されている²⁾。いっぽう、前立腺には、酸性フォスファターゼをはじめとしたりソゾーム内の諸酵素、形質膜など、前立腺の糖タンパクや、ムコ多糖は巾広く分布するので、それらの検討はきわめて重要と思われる。

さらにムコ多糖は上皮細胞にもわずかにふくまれるが間質、結合組織中にも存在している。結合組織は一般に細胞成分、線維成分、基質より成り、ムコ多糖はその基質成分として蛋白質、ペプチドなどと結合して、複雑な複合体として存在している。

前立腺においても近年、上皮細胞とムコ多糖をふくむ間質結合組織との関係が検討され、その結果、両者間に密接な相互関係の存在することがあきらかにされ、間質、結合組織の重要性が強く認識されつつある³⁾。すなわち、前立腺上皮の発生や分化の方向づけ維持、増殖などに間質結合組織は重要な役割を果たし⁴⁾、逆に間質結合組織は上皮細胞によりその量を調節されている⁵⁾、という事実が示されてきた。

癌組織においても、間質、結合組織と癌細胞とは、細胞性間質反応や癌細胞が結合組織におよぼす障害作用⁶⁾のほか、結合組織の構成成分であるムコ多糖も

これらの相互関係において重要な役割を果たすことが、認識されるようになってきた。すなわち癌細胞によって、ある特定のムコ多糖が合成され⁷⁾、さらにはムコ多糖が癌の浸潤性増殖に重要な役割をもつという報告があり⁸⁾、癌組織とムコ多糖とは密接な関係にあることがしめされてきた。それゆえ、前立腺組織中のムコ多糖の検討はきわめて重要と思われる。

ところが前立腺組織においては、正常例、肥大症、および癌組織のいずれも糖タンパク、酸性ムコ多糖などの複合糖質に関する組織化学的な研究は乏しく、さらに糖タンパクの糖残基の同定や、ムコ多糖の酸性基の有無などによって分類される異性体中の個々のムコ多糖、ムコ多糖群の同定に関する報告はまれである。

今回筆者は、前立腺正常例、肥大症例、癌症例組織中の複合糖質を組織化学的に、糖タンパクはPAS反応とlectin (Concanavalin A, Ricinus communis agglutinin など) 反応にて、酸性ムコ多糖は、酵素消化などの方法を併用して、フタロシアニン色素のひとつアルシアン青にて検索し、若干の興味ある知見を得たので報告する。

対 象

実験に用いた前立腺組織は、1980年1月より1983年12月までに、名古屋大学病院、ならびに関連病院を受診した患者より得られた。

1) 前立腺癌 40検体, 36症例, (未治療 36検体, 既治療 4検体), 57歳より89歳まで。平均72.8歳。

Stage A 2例, Stage B 4例, Stage C 6例, Stage D 29例,

2) 前立腺肥大症 27症例, 61歳より89歳まで。平均71.5歳

3) 正常前立腺 8症例 25歳より52歳まで。平均40.6歳 (膀胱腫瘍, 前立腺炎の疑いなどで手術的、針生検などで得られた前立腺組織)

総計75検体, 71症例である。(Table 1~3)

Table 1. 前立腺癌対象症例。(組織診断, 分化度, Stage 分類, PAP, ALP 測定値, PO-RCA-DAB, ConA-PO-DAB 染色結果)

高分化型						
no	age	stage	PAP(ng/ml)	Alp	ConA	PO-RCA
1	69	D	748	W.N.L.	+	±
2	81	D	58	437	2+	2+
3	62	A	1.3	W.N.L.	2+	2+
4	76	A	3.3	W.N.L.	±	2+
5	78	B	1.1	W.N.L.	±	+
6	78	C	(W.N.L.)	W.N.L.	±	+
7	62	B	1.9	W.N.L.	±	±
ave	70.3		135.6±274.6			
中分化型						
no	age	stage	PAP(ng/ml)	Alp	ConA	PO-RCA
1	83	D	1432	164	2+	+2
2	76	D	14.9	W.N.L.	2+	+
3	76	D	1.8	W.N.L.	±	±*
4	75	D	17.5	W.N.L.	2+	2+
5	76	C	(16.2)	W.N.L.	±	2+
6	76	C	2.4	±	+
7	76	D	214.0	+	±
8	81	D	19.1	226	±	+
9	81	B	(11.2)	W.N.L.	±	±**
10	82	D	(W.N.L.)	W.N.L.	±	±**
11	85	D	40.1	180	+	±
12	60	D	10.4	502	±	+***
13	60	D	3.8	329	±	±***
14	74	D	8.4	W.N.L.	2+	+
15	73	D	3.6	480	+	2+
16	57	D	13.6	239	±	+
17	73	D	2.9	641	±	+
18	68	D	5.2	W.N.L.	±	±
19	69	D	1.5	W.N.L.	±	+****
20	69	D	1.1	W.N.L.	±	+****
ave	73.5		105.4±335.2			
低分化型						
no	age	stage	PAP(ng/ml)	Alp	ConA	PO-RCA
1	69	D	1.2	302	±	±*
2	65	D	600	248	+	±*
3	73	C	2.2	186	+	±
4	79	D	(11.8)	407	+	±
5	77	B	4.4	W.N.L.	2+	2+
6	71	C	(W.N.L.)	W.N.L.	±	±
7	76	D	130.4	196	+	+
8	80	D	2.8	191	±	±*
9	80	D	24.1	W.N.L.	±	±
10	75	D	1.7	200	±	±*
11	74	D	1.1	W.N.L.	±	±
12	70	D	(W.N.L.)	W.N.L.	±	±*
13	60	C	(W.N.L.)	W.N.L.	+	+
ave	73.0		85.3±186.2			

前立腺癌症例全体では、平均年齢72.8歳。PAP値は $m \pm$

SD(平均±標準偏差)=105.4±289.6ng/ml

(PAP): King-Kint法 正常値; 1.4~5.0 IU/L

Alp: Bessey Lowry法 正常値; 30~115 IU/L

W.N.L.: within normal limit

*: 癌死症例をしめす。

*: 同一症例で治療前後をしめす。

ConA-PO-DAB, PO-RCA-DAB染色は染色結果をしめす。

2+: 強陽性例 +: 中等度陽性例 ±: 弱陽性例

材 料

前立腺組織の採取方法は、経尿道的切除術(以下TUR)45例。前立腺摘除術19例。針生検11例であった。TUR切片は可及的すみやかに灌流液より取り出した。摘除術、針生検にても、採取時に可及的に組織の圧迫や挫滅を少なくするよう留意した。

TUR切片や針生検組織はそのまま、摘除術による組織は約 $5 \times 5 \times 2$ mm大の小片にして固定した。組織の固定には、1%塩化セチルピリジニ Cetylpyridinium chloride(以下CPC)-10%中性ホルマリン液にて、4°Cで、48~72時間おこなった。その後エタノールにて脱水、ベンゼンにて透徹し、パラフィン包埋をおこない、必要に応じて厚さ4 μ に薄切し、キシロールにて脱パラフィンをおこなった。

本実験に先立ち、予備実験としてRadioimmunoassay(以下RIA)法による血中前立腺性酸フォスファターゼ(以下PAP)測定やBessey-Lowry法による血中アルカリフォスファターゼ測定をおこなった。10mlの静脈採血をTUR、摘除術などの前におこない、すみやかに血清に分離し、PAP用血清は-80°Cにて凍結保存後、一括して測定に供した。アルカリフォスファターゼは、病院中央検査部に依頼し随時測定した。なお直腸診や経尿道的操作の後には最低1日採血をさけた⁹⁾。

実 験 方 法

1. 予備実験

1) ヘマトキシリン-エオジン染色(HEX染色)

Harrisのヘマトキシリン液を用い、組織診断をおこなった。

2) RIA法による血中PAP値測定

使用キット; Travenol社のGamma-Dab PAP kit

測定方法、基礎的検討、臨床的検討、正常値などの詳細は筆者がすでに報告した¹⁰⁾。

平均±標準偏差=1.78±1.07 ng/mlである。

2. 本実験

(A)複合糖質染色

1) Periodic Acid-Schiff染色(PAS染色)

方法は、McManus(1948)¹¹⁾にしたがった。

2) α -アミラーゼ消化後PAS染色

α -アミラーゼ消化は、Lillie and Fullmer(1976)¹²⁾の麦芽ジアスターゼ消化法をおこなった。塩化ナトリウム8g、無水第2リン酸ソーダ1.8g、第1リン酸カリウム0.8gを溶解し蒸留水で1,000mlとした緩衝

Table 2. 前立腺肥大症対象症例。(PAP 測定値)

no	patient	age	PAP(ng/ml)
1	K.Y.	63	1.8
2	R.I.	68	1.1
3	K.T.	71	1.3
4	T.M.	69	1.1
5	T.K.	72	...
6	H.A.	89	1.2
7	T.K.	70	2.0
8	K.N.	65	1.5
9	G.N.	69	1.1
10	G.K.	74	1.5
11	M.A.	72	1.6
12	K.W.	69	5.1
13	T.K.	72	1.0
14	H.O.	73	1.2
15	H.T.	75	1.6
16	I.O.	70	1.2
17	T.M.	80	28.9
18	M.Y.	70	3.7
19	S.W.	62	(4.3)
20	S.M.	80	1.1
21	K.O.	61	1.4
22	M.M.	75	...
23	M.H.	78	(2.0)
24	J.I.	77	(0.2)
25	E.M.	76	3.9
26	J.Y.	62	...
27	T.S.	75	...
ava		71.5	3.16±6.0

(PAP): King-Kint法

正常値: 1.4~5.0 IU/L

Table 3. 正常前立腺対象症例。(PAP 測定値)

no	patient	age	diagnosis	PAP(ng/ml)
1	Y.K.	38	B.T.	1.0
2	K.T.	33	B.T.	1.5
3	H.H.	49	B.T.	1.4
4	K.K.	52	B.T.	1.2
5	H.W.	39	B.T.	1.6
6	M.A.	48	B.T.	...
7	K.I.	30	prostatitis?	1.5
8	H.T.	36	prostatitis?	...
ave		40.6		1.37±0.21

B.T.: bladder tumor

液をつくり、それに1%麦芽ジアスターゼを溶解した液を作り、この溶液で、37°C、1時間消化をおこなった後、PAS染色をおこなった。

アルシアン青(AB)染色; アルシアン青はICI (Imperial Chemical Industry) 製 (Blackley, Manchester) の8GXを用いた。なお染色液のpHはpH 1.0 (Lev and Spicer, 1964)¹³⁾と、pH 2.5

(Pearse, 1968)¹⁴⁾の2種類を作製し使用した。アルシアン青はフタロシアン色素に属し、組織の核酸、酸性タンパク質、あるいは酸性脂肪と反応しにくく、酸性ムコ多糖検出のためのもっとも優秀な試薬のひとつである¹⁵⁾。

3) アルシアン青 (pH 2.5) 染色法

1. 切片を脱パラフィンし水に入れる。
2. 1%アルシアン青 8GX-3%酢酸溶液 (pH 2.5) (新調し濾過したもの) にて、30分染色する。
3. 流水にて5分洗う。
4. エタノールにて脱水後キシロールにて透徹し封入する。

結果: 弱酸性硫酸ムコ糖, ヒアルロン酸, シアル酸ムコ糖は青く染色する。強酸性ムコ糖は淡青色に着色するか染まらない。

4) アルシアン青 (pH 1.0) 染色法

1. 切片を脱パラフィンし水に入れる。
2. 1%アルシアン青 8GX-0.1N 塩酸溶液 (pH 1.0) にて30分染色する。
3. 切片を濾紙でおおい、色素液を吸いとる。
4. エタノールにて脱水後キシロールにて透徹封入する。

結果: 硫酸複合糖質だけが青く着色する。

5) 酵素消化実験1. コンドロイチナーゼ ABC, コンドロイチナーゼ AC, 放線菌ヒアルロニダーゼ, 辜丸ヒアルロニダーゼ, シアリダーゼの5種類の酵素を使用した。切片を脱パラフィンし水洗後、上記の酵素で処理しアルシアン青 (pH 2.5) 染色をおこなった。

6) 酵素消化実験2. コンドロイチナーゼ ABC, コンドロイチナーゼ AC, 辜丸ヒアルロニダーゼの3種類の酵素を使用した。切片を脱パラフィンし水洗後、上記の酵素で処理しアルシアン青 (pH 1.0) 染色をおこなった。

各酵素の消化法は、つぎのとおりである。

(1)シアリダーゼ (Boehringer Gm bH, West Germany), AB (pH 2.5) 染色前に 0.04 M の塩化カルシウムを含む 0.1 M 酢酸塩緩衝液に 1 mg/ml の濃度にシアリダーゼを溶解し、この液で 40°C にて12時間処理する (Spicer et al. 1976)¹⁶⁾。

(2)放線菌ヒアルロニダーゼ (天野製薬), AB (pH 2.5) 染色前に、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.0) 中に、100 TRU/ml の濃度に放線菌ヒアルロニダーゼを溶解し、この液で 40°C にて3時間で処理する (Yamada, 1973)¹⁷⁾。

(3)辜丸ヒアルロニダーゼ (生化学工業), AB (pH 1.0) または AB (pH 2.5) 染色前に、0.1 M リン酸緩衝

液 (pH 5.5) 中に、0.5 mg/ml の濃度に辜丸ヒアルロニダーゼを溶解し、この液で 37°C にて 3 時間処理する (Leppi and Stoward 1965)¹⁸⁾。

(4) コンドロイチナーゼ ABC (生化学工業), AB (pH 1.0) または AB (pH 2.5) 染色前に、1.25 U/ml の濃度にコンドロイチナーゼ ABC を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中に溶解し、この液で 37°C にて 2 時間、処理する (Yamada 1972, 1974)^{19,20)}。

(5) コンドロイチナーゼ AC (生化学工業), AB (pH 1.0) または AB (pH 2.5) 染色前に、1.25 U/ml の濃度にコンドロイチナーゼ AC を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.3) 中に溶解し、この液で 37°C にて 2 時間、処理する (Yamada, 1972, 1974)^{19,20)}。

なお、酵素消化法では、常に熱などで失活させた酵素液で処理、溶媒のみで処理した対照切片を作り、比較検討した。

7) Concanavalin A-peroxidase-diaminobenzidine 法 (ConA-PO-DAB 法)²¹⁾

1. 脱パラフィンした切片を水に入れる。

2. リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (phosphate buffer saline: PBS) (0.2~0.5 M 塩化ナトリウム含有 0.05 M リン酸塩緩衝液 pH 7.2) 中に 5 分入れる。

3. ConA (Pharmacia Fine Chemicals Ltd. Uppsala, Sweden) を 0.25 mg/ml の濃度になるように PBS に溶解し、そのなかに、切片を室温で 15~30 分浸漬する。

4. PBS にて 5 分洗浄、3~5 回液を変えてくりかえす。

5. PO[horseradish PO (Boehringer Mannheim, GmbH. West Germany)] を 0.25~0.5 mg/ml の濃度になるように、PBS 中に溶解し、そのなかに切片を室温で 15~30 分浸漬する。

6. PBS にて 5 分洗浄、3~5 回液を変えてくりかえす。

7. 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) 中に 3~5 分浸漬する。

8. DAB-H₂O₂ トリス-塩酸緩衝液 [0.1 M トリス-塩酸緩衝液 pH 7.6) 4.9 ml, 1% H₂O₂ 0.1 ml, DAB (3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (Tokyo Kasei) 2.5 mg の混合液) のなかに室温で、5~10 分浸漬する。

9. 蒸留水で洗浄する。

10. 100% エタノールにて脱水後キシロールにて透徹し封入する。

結果：複合糖質の α -D-mannose および α -D-glucose 残基は褐色に着色する。

8) ConA-PO-DAB-periodic acid-m-aminophenol-Fast-black salt K (ConA-PO-DAB-PA-AP-FBK) 法²²⁾。

1. ~9. までは 7) の方法でおこなう。

10. 1% periodic acid にて 10 分酸化する。

11. 流水にて 10 分洗浄する。

12. 氷酢酸に 1 分入れる。

13. 11% m-aminophenol 氷酢酸溶液にて 60 分室温で処理する。

14. 流水にて 10 分洗浄後、蒸留水にて洗浄する。

15. Fast black salt K 液 [FBK を 3 mg/ml の濃度を含む 0.1 M ペロナール-塩酸緩衝液 (pH 8.0)] 中に 2 分浸漬して、アゾカップリングする。

16. 0.1 N 塩酸にて 5 分ずつ 3 回洗浄する。

17. 流水にて 10 分洗浄する。

18. エタノール列にて脱水しキシロールにて透徹封入する。

結果：複合糖質の α -D-mannose および α -D-glucose 残基は褐色に着色し、1,2-glycol 基は黒紫色に着色する。PAS 反応の色調と DAB 反応の色調とは識別が困難なため、DAB の褐色と識別可能な PA-AP-FBK 反応を使用した²³⁾。

9) Peroxidase-labelled Ricinus communis agglutinin-diaminobenzidine (PO-RCA-DAB) 法²⁴⁾。

1. 脱パラフィンした切片を水に入れる。

2. PBS 中に 5 分入れる。

3. RCA-PO 液 [Nicolson-Blaustein の方法で純化した RCA の RCA₁₂₀ 分画を用いてこれに PO を glutaraldehyde 法によって結合し OD₂₈₀ 値 2.14, OD₄₀₃ 値 0.20 の RCA-PO 液を作製し、これを PBS (pH 7.2) にて約 20 倍に希釈した液] に室温にて 15~30 分浸漬する。

4. PBS にて 5 分ずつ 3~5 回洗浄する。

5. 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) 中に 5 分ずつ 2 回入れる。

6. DAB-H₂O₂ トリス-塩酸緩衝液 [0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) が 4.9 ml, 1% H₂O₂ が 0.1 ml, そして DAB 2.5 mg の混合液] 中に室温にて 5~10 分浸漬する。

7. 蒸留水で洗浄する。

8. エタノール列にて脱水し、キシロールにて透徹し封入する。

結果：複合糖質の β -D-galactose 残基は褐色に着色する。

以上の Lectin-PO-DAB 反応において ConA-PO-DAB 反応では、PO-DAB 反応と DAB 反応の

2種を、PO-RCA-DAB 反応では DAB 反応のみを対照実験として実施した。

(B) タンパク検出用染色

a) テトラゾニウム (TZ) 反応²⁵⁾

1. 切片を蒸留水に入れる。
2. 新たに調整した 0.2% ファースト青 B (テトラゾ化 0-ジアニジン) 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.2) に室温にて 5 分浸漬する。
3. 水洗後 0.1 M ペロナル-酢酸緩衝液 (pH 9.2) に入れ 2 分ずつ 3 回洗浄する。
4. H 酸 (1-amino-8-naphthol-3, 6-disulfonic acid) を飽和させた (1 g/50 ml) 0.1 M ペロナル-酢酸緩衝液 (pH 9.2) に 15 分浸漬する。
5. 3 分水洗してからエタノール脱水し、キシロールにて透徹する。

結果：陽性反応部位は赤褐色に着色する。

b) マーキュリーオレンジ (RSR) 反応²⁶⁾

1. 切片を 100% エタノールに入れる。
2. マーキュリーオレンジのジメチルホルムアミド (または 80~100% エタノール) 飽和溶液に 16~18 (1~3) 時間浸漬する。
3. 100% エタノールで 2 回洗浄し、キシロールにて透徹し封入する。

結果：陽性反応部位は淡橙色から深橙赤色に着色する。

c) ニンヒドリン-Schiff (NIN-S) 反応²⁷⁾

1. 切片を水に入れる。
2. 0.5% ニンヒドリン、100% エタノール液に 37°C にて 5~20 時間浸漬する。
3. 流水にて 2~5 分洗浄した後、Schiff 試薬に 15~25 分浸漬する。
4. 流水にて 10 分洗浄する。
5. エタノール列にて脱水し、キシロールにて透徹し封入する。

結果：陽性反応部位は赤紫色に着色する。

d) 過燐酸アルシアン青 (PFA-AB) 反応²⁸⁾

1. 脱パラフィンした切片を水に入れた後、余剰の水をろ紙で吸いとる。
2. ガスを除くため十分混合した過燐酸液 (98% 燐酸 40 ml, 30% 過酸化水素水 4 ml, 濃硫酸 0.5 ml を混合し 1 時間以上放置し、24 時間以内に使用する。) に 5 分浸漬する。
3. 流水で 10 分水洗後、70%, 100% エタノールで洗浄し、濾紙で液を吸いとりふたたび流水で洗浄する。
4. 切片が乾燥するまで 50~60°C に加温する。
5. 100% エタノールにて洗浄の後流水で 1 分洗浄する。

6. アルシアン青 3 g を 2 N 硫酸 100 ml (70°C に熱し溶解させた後冷却し、濾過後ただちに使用する) に溶解した液 (pH 0.2~0.3) に室温で 1 時間浸漬する。

7. 5 分水洗し必要ならば対照染色をする。

8. エタノール列で脱水、キシロールにて透徹し封入する。

結果：強陽性反応部位は深青色に、弱陽性反応部位は淡青色に着色する。

e) D. D. D. (2,2'-dihydroxy-6,6'-dinaphthyl disulfide) 反応²⁹⁾

1. 脱パラフィンした切片を水に入れ D. D. D. 液 (D. D. D. 25 mg を 0.1 M ペロナル-酢酸緩衝液 pH 8.5, 35 ml と 100% エタノール 15 ml とに溶解したもの) に 50°C にて 1 時間浸漬する。

2. D. D. D. 液を室温まで冷却したのち切片を蒸留水で短時間洗う。

3. pH 4.0~4.5 の酢酸水を 2 回変えて 10 分洗浄する。

4. 切片を漸次高濃度のエタノールに入れて洗浄、最後に 100% エタノールにて 5 分ずつ 2 回洗浄する。

5. 蒸留水にて洗浄する。

6. 新たに調整したファースト青 B 液 [ファースト青 B を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 1 mg/ml となるように溶解] に室温にて 2 分浸漬する。

7. 流水にて水洗。

8. エタノール列にて脱水、キシロールにて透徹し封入する。

判定：強陽性反応部位は青色に、弱陽性反応部位は赤色に着色する。

(C) 酸フォスファターゼ検出用染色

酵素抗体法による³⁰⁾。

第 1 抗体：抗ヒト前立腺性酸フォスファターゼ家兎抗血清 (Miles-Yeda Ltd. Kiryat, Weizmann, Rehovot, Israel)

第 2 抗体：HRP 標識抗家兎 IgG 山羊抗体 (Miles-Yeda Ltd. Kiryat, Weizmann, Rehovot, Israel) を使用した。

1. 脱パラフィンした切片を PBS (0.01 M リン酸緩衝食塩水, 0.01 M リン酸緩衝液 1,000 ml 中に NaCl 8.5 g を含む, pH 7.2) にて 5 分ずつ 6 回洗浄する。

2. 必要に応じて過ヨウ素酸、水酸化ホウ素ナトリウム水溶液などで内因性ペルオキシダーゼ除去をおこなう。

3. 湿室を作製する。

4. PBS を拭い正常山羊血清を滴下、攪拌し、30分湿室中に室温にて放置する。

5. PBS を拭い第1抗体を滴下、攪拌し、12時間湿室中に室温にて放置する。対照として抗体に変えて正常家兎血清とPBSとを滴下した2種類を作製する。

6. PBS で5分ずつ6回氷水中にて洗浄する。

7. PBS を拭い第2抗体を滴下し攪拌し、1時間湿室中に室温にて放置する。対照の2種も同様におこなう。

8. PBS にて5分ずつ6回氷水中にて洗浄する。

9. DAB-H₂O₂ (DAB 20 mg を 75 ml の 0.05 M のトリス-塩酸緩衝液 pH 7.6 に溶解し、5% H₂O₂, 0.1 ml を加えて pH 7.6 に揃えて同緩衝液にて全量を 100 ml にして、使用する) 中にて10分間発色する。

10. 5回水洗後、エタノールにて脱水、キシロールにて透徹封入する。

実験に先だち、第1, 2抗体の稀釈濃度、反応時間決定のための予備実験として、第1抗体、第2抗体の濃度や反応時間をそれぞれ変化させて、1.~10. の操作を繰り返しておこなった。その結果稀釈濃度は、第1抗体は600倍、第2抗体は2,000倍が、反応時間は第1抗体は12時間、第2抗体は1時間が最適と決定した。以後これらの条件にて本実験をおこなった。

結 果

1. 予備実験

1)HEX 染色による前立腺癌の組織診断を Table 1 にしめす。高分化型腺癌7例、中分化型腺癌20例、低分化型腺癌13例であった³¹⁾。

2)血中の PAP 値を Table 1~3 にしめす。正常前立腺例ではすべて 1.7 ng/ml 以下であり、 $m \pm SD$ (平均±標準偏差)= 1.37 ± 0.21 ng/ml であった。前立腺肥大症では、2例を除いてほかは 5.0 ng/ml 以下で、組織診断にて prostatic infarction をともなっていた1例は 28.9 ng/ml ととくに高値をしめた。 $m \pm SD=3.16 \pm 6.0$ ng/ml であった。癌症例では高、中、低分化型とも極端な高値をしめた症例と、正常範囲内の症例とがあり一定の傾向はみられなかったが極端な高値をしめた症例はすべて Stage D であった。 $m \pm SD=105.4 \pm 289.6$ ng/ml であり、それぞれ高分化型は $m \pm SD=135.6 \pm 274.6$ ng/ml、中分化型では $m \pm SD=105.4 \pm 335.2$ ng/ml、低分化型では $m \pm SD=85.3 \pm 186.2$ ng/ml であった。なおこれらの計算にはすべて、RIA 法による PAP 値のみを使用し

た。

2. 本実験

1)PAS 染色によると、前立腺肥大症組織においては、間質、上皮細胞、腺腔内物質ともに反応陽性であるが、間質において強く、なかでも上皮細胞周囲が濃染し層状に腺上皮をとりかこんでいた。上皮細胞の染色性はやや弱い、その腺腔側細胞質は比較的強かった。また上皮細胞中には PAS 陽性に濃染する小顆粒が存在した。腺腔内物質は強陽性をしめた。前立腺癌組織では間質の染色性は肥大症とほぼ同様であるが細胞を包囲し濃染する層の存在は各症例により一定しなかった。前立腺癌では細胞の染色性は間質に比べ弱く、濃染する小顆粒はほとんど認められなかった。正常前立腺例では肥大症とほぼ同様の結果であった。

2) α -アミラーゼ消化をおこなうと、肥大症組織の間質は染色性に変化無く、上皮細胞の染色性にもほとんど変化はないが、細胞質中の小顆粒の消失がみられた。前立腺癌においては間質、細胞ともにほとんど変化はなかった。正常前立腺組織では間質はほとんど変化せず、腺上皮細胞の小顆粒の消失が肥大症と同様にみられた。そのほかの変化も少なかった。

3)アルシアン青 (pH 2.5) 染色においては、前立腺肥大症組織では、間質、腺上皮細胞とも反応陽性であるが、間質では腺傍周囲に染色性の強い部位がみつめられた。上皮細胞は間質に比して染色性が強いので、間質と上皮細胞との差が比較的明瞭であった。腺腔内物質は強陽性反応を示した。前立腺癌においては間質、癌細胞ともに反応は肥大症のそれに比して強陽性であり、間質、癌細胞両者間の染色性の差は、あきらかに癌細胞においてより強い。肥大症にみられたような染色性の強い層は癌細胞の周囲にはみられなかったが、両者の境界は、間質と癌細胞との染色性の相違により明瞭な症例が大多数であった。正常前立腺例は肥大症とほぼ同様の結果であったが、間質の染色性は弱かった (Fig. 1~3)。

4)アルシアン青 (pH 1.0) 染色においては、全般的に反応は AB (pH 2.5) 反応に比して弱陽性であった。肥大症においては AB (pH 2.5) とは異なり、間質が上皮細胞の染色性よりも強く、腺傍周囲がもっとも青染した。上皮細胞はほとんど染色されなかった。これに対して腺腔内物質は濃染した。癌組織においては肥大症と異なり間質、癌細胞とも染色性は強く、両者とも青染した。しかし間質の方がより強かった。正常前立腺例においては、肥大症とほぼ同様の所見をしめたが、染色性はやや弱かった (Fig. 4~6)。

5)酵素消化実験1. コンドロイチナーゼ ABC, コン

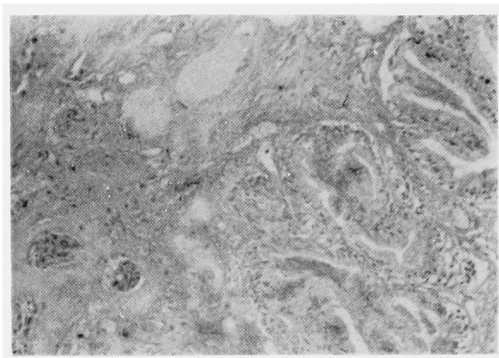


Fig. 1. アルシアン青 (pH 2.5) 染色 (正常前立腺組織)



Fig. 4. アルシアン青 (pH 1.0) 染色 (正常前立腺組織)

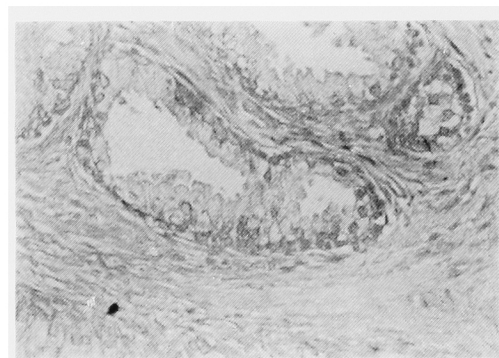


Fig. 2. アルシアン青 (pH 2.5) 染色 (前立腺肥大症組織)

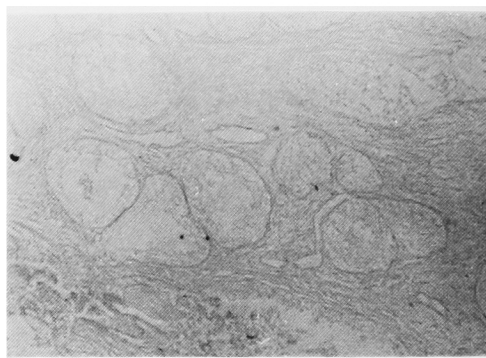


Fig. 5. アルシアン青 (pH 1.0) 染色 (前立腺肥大症組織) 基底膜が濃染している。

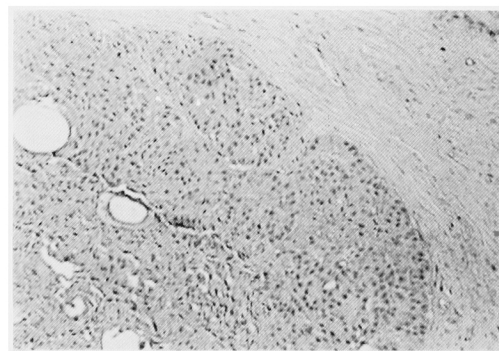


Fig. 3. アルシアン青 (pH 2.5) 染色 (前立腺癌組織) 癌細胞の染色性が強い。

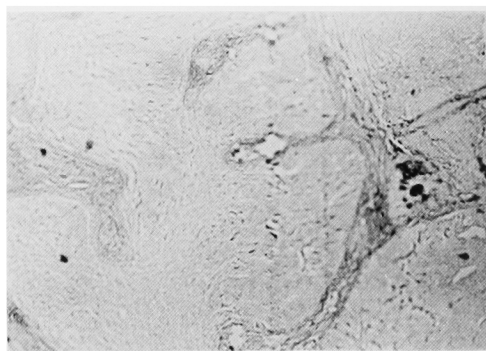


Fig. 6. アルシアン青 (pH 1.0) 染色 (前立腺癌組織) 癌間質の染色性が強い。



Fig. 7. ConA-PO-DAB 染色 (正常 前立腺組織)

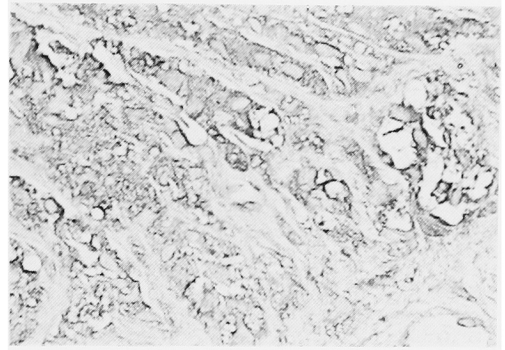


Fig. 10. ConA-PO-DAB 染色, 中等度陽性例 (前立腺癌組織)

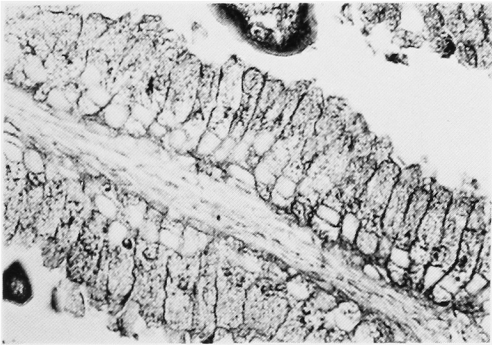


Fig. 8. ConA-PO-DAB 染色 (前立腺肥大症組織)

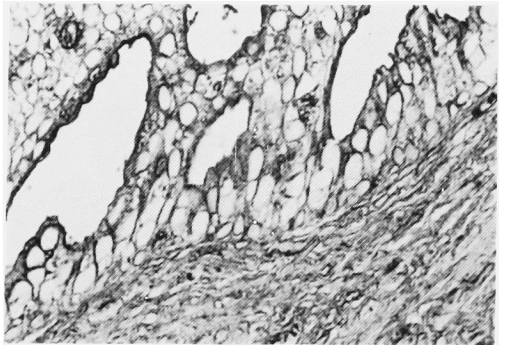


Fig. 11. ConA-PO-DAB 染色, 弱陽性例 (前立腺癌組織)

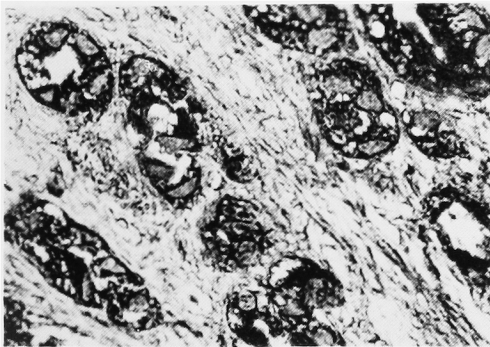


Fig. 9. ConA-PO-DAB 染色, 強陽性例 (前立腺癌組織)

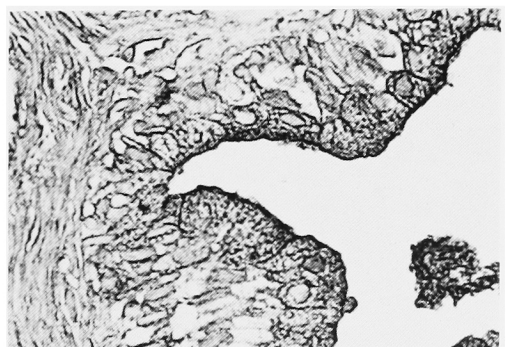


Fig. 12. PO-RCA-DAB 染色 (正常 前立腺組織)

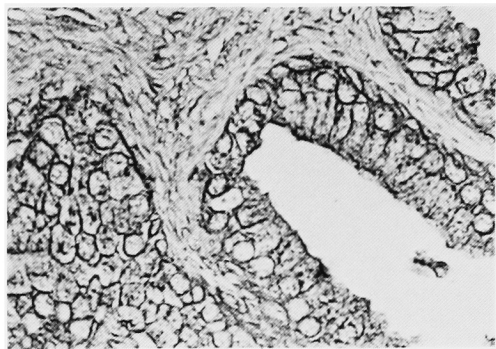


Fig. 13. PO-RCA-DAB 染色 (前立腺肥大症組織)

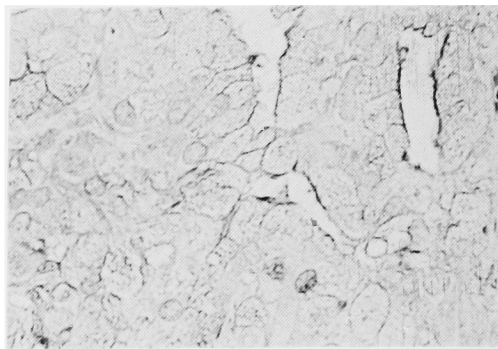


Fig. 16. PO-RCA-DAB 染色, 弱陽性例 (前立腺癌組織)



Fig. 14. PO-RCA-DAB 染色, 強陽性例 (前立腺癌組織)

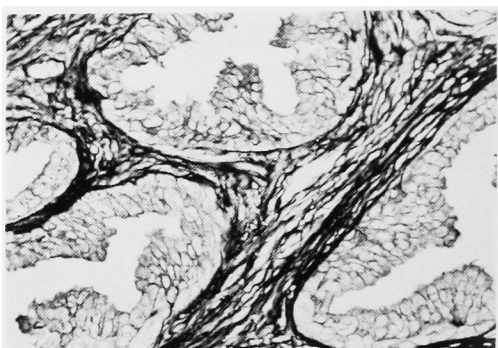


Fig. 17. ConA-PO-DAB-AP-PA-FBK 染色, (前立腺肥大症組織) 間質が黒紫色に, 上皮細胞が褐色に染まる。

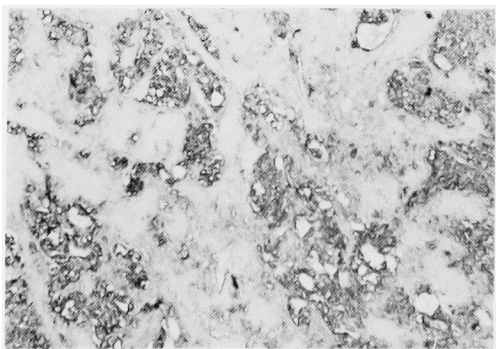


Fig. 15. PO-RCA-DAB 染色, 中等度陽性例 (前立腺癌組織)

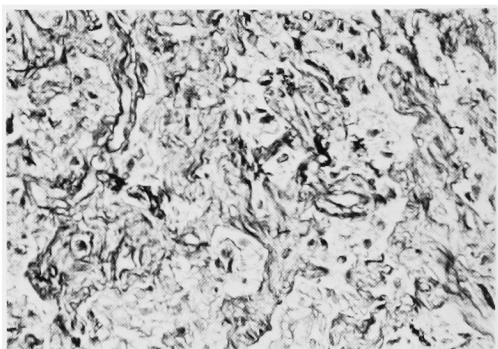


Fig. 18. ConA-PO-DAB-AP-PA-FBK 染色, (前立腺癌組織, 中分化型) 前立腺肥大症と異なり間質の染色性は弱い。

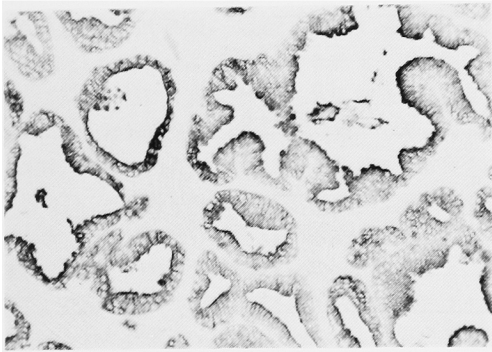


Fig. 19. PAP 検出用染色, (前立腺肥大症組織)
腺上皮細胞のみ染色されている。

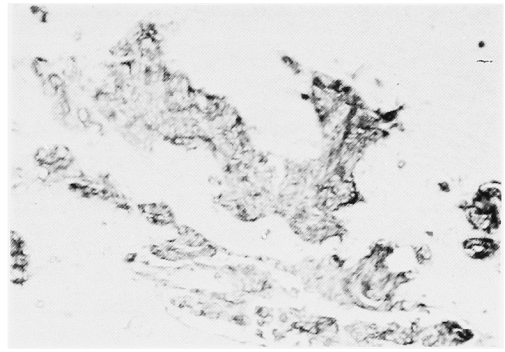


Fig. 22. PAP 検出用染色, (前立腺癌組織, 低分化型) 癌細胞の染色性は, 肥大症やほかの分化度の癌細胞ともほとんど差がない。

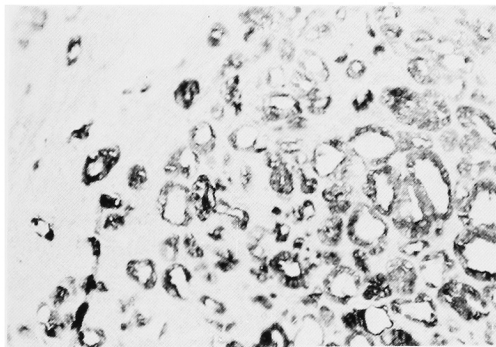


Fig. 20. PAP 検出用染色, (前立腺癌組織, 高分化型)

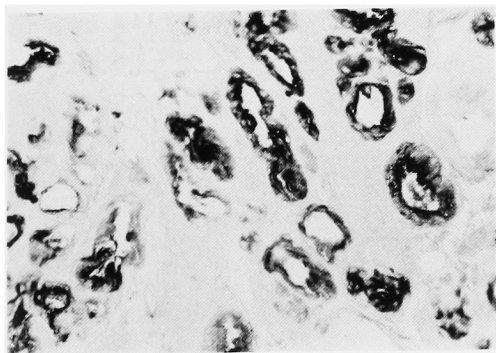


Fig. 21. PAP 検出用染色, (前立腺癌組織, 中分化型)

ドロイチナーゼ AC, 放線菌ヒアルロニダーゼ, 睾丸ヒアルロニダーゼ消化後アルシアン青 (pH 2.5) 染色をおこなうと前立腺肥大症では, いずれの酵素消化でも間質, 上皮細胞とも染色性が有意に低下した。コンドロイチナーゼ ABC と AC との消化効果の比較では, コンドロイチナーゼ ABC の方がより強かった。睾丸ヒアルロニダーゼと放線菌ヒアルロニダーゼでは前者の方が消化効果がより強かった。しかし腺腔内物質は消化によりほとんど影響されなかった。前立腺癌組織にても間質, 癌細胞とも肥大症とほぼ同様の結果でありコンドロイチナーゼ ABC, AC, 睾丸ヒアルロニダーゼ, 放線菌ヒアルロニダーゼにより有意に消化され, その消化効果もほぼ同様であった。正常前立腺組織においてもほぼ同様の結果をしめした。シアリダーゼ消化では肥大症, 正常前立腺例では間質, 上皮細胞とも消化効果はなく, AB 染色性は不変であった。癌組織では癌細胞のみシアリダーゼ消化効果がみられた (Table 4)。

6) 酵素消化実験2. コンドロイチナーゼ ABC, 睾丸ヒアルロニダーゼ消化後アルシアン青 (pH 1.0) 染色にては, 前立腺肥大症, 正常前立腺例とも, 間質は著明に消化され, ほとんど染色性を失った。しかし腺腔内物質は不変であった。いっぽう, コンドロイチナーゼ AC 消化効果は, コンドロイチナーゼ ABC 消化効果に比して弱く, 間質の染色性の低下も軽度であった。他方癌組織でも, コンドロイチナーゼ ABC, AC, および 睾丸ヒアルロニダーゼ消化後のアルシアン青 (pH 1.0) 染色では, 染色性の低下がみられたが肥大症とは異なり, 癌組織ではコンドロイチナーゼ AC の消化効果はほかの二酵素とほぼ同様の結果をしめした (Table 5)。

Table 4. 諸酵素の消化結果〔アルシアン青 (pH 2.5) 染色前〕

正常前立腺						
	非消化	Chase-ABC	Chase-AC	THyase	SHyase	Siali
上皮細胞	3+B	±	+B	±	+B	3+B
基底膜	3+B	±	+B	±	+B	3+B
間質	3+B	±	+B	±	+B	3+B

前立腺肥大症						
	非消化	Chase-ABC	Chase-AC	THyase	SHyase	Siali
上皮細胞	3+B	±	+B	±	+B	3+B
基底膜	3+B	±	+B	±	+B	3+B
間質	3+B	±	+B	±	+B	3+B

前立腺癌						
	非消化	Chase-ABC	Chase-AC	THyase	SHyase	Siali
癌細胞	5+B	2+B	3+B	2+B	3+B	4+B
間質	4+B	2+B	2+B	2+B	2+B	4+B

Chase-ABC: コンドロイチナーゼABC消化

Chase-AC: コンドロイチナーゼAC消化

THyase: 辜丸ヒアルロニターゼ消化

SHyase: 放線菌ヒアルロニダーゼ消化

Siali: シアリダーゼ消化

B: blue, ±: A feeble or doubtful reaction

1~n: The number being proportional to the intensity of reaction

Table 5. 諸酵素の消化結果〔アルシアン青 (pH 2.5) 染色前〕

正常前立腺				
	非消化	Chase-ABC	Chase-AC	THyase
上皮細胞	±	±	±	±
基底膜	2+B	±	+B	+B
間質	+B	±	±	±

前立腺肥大症

	非消化	Chase-ABC	Chase-AC	THyase
上皮細胞	+B	±	±	±
基底膜	2+B	+B	+B	+B
間質	+B	±	±	±

前立腺癌

	非消化	Chase-ABC	Chase-AC	THyase
癌細胞	2+B	±	±	±
間質	3+B	±	±	±

Chase-ABC: コンドロイチナーゼABC消化

Chase-AC: コンドロイチナーゼAC消化

THyase: 辜丸ヒアルロニターゼ消化

B: blue, ±: A feeble or doubtful reaction

1~n: The number being proportional to the intensity of reaction

Table 6. PO-RCA-DAB 染色と前立腺癌の分化度との関係をしめす

	強陽性	中等度陽性	弱陽性
Stage A	2	0	0
B	1	1	2
C	1	3	2
D	3	9	15

$\chi^2=9.824$ $p=0.1333$

Table 7. PO-RCA-DAB 染色と前立腺癌のStage との関係をしめす

	強陽性	中等度陽性	弱陽性
高分化型	3	2	2
中	4	9	7
低	1	2	10

$\chi^2=8.5348$ $p=0.0753$

Table 8. ConA-PO-DAB 染色と前立腺癌の分化度との関係をしめす

	強陽性	中等度陽性	弱陽性
高分化型	2	1	4
中	4	2	14
低	1	5	7

$\chi^2=4.2421$ $p=0.3773$

7) ConA-PO-DAB 反応は、正常前立腺においては間質、腺上皮細胞ともに陽性反応をしめし、ほぼ同程度か上皮細胞にやや強い染色性をしめし、その上皮細胞は主として腺腔側に強く染色された上皮細胞顆粒を含んでいた。核は反応陰性であった。前立腺肥大症においても正常前立腺例とほぼ同様の結果であった。前立腺癌組織では間質の染色性が、肥大症と比較して強いものの、癌症例間での染色性の差はほとんど認められなかった。癌細胞の核は陰性で染色されず、細胞質は反応陽性で均等に顆粒状に染まるが、肥大症と比較して、反応の強弱が症例によって存在し、強染する症例、やや強い症例、弱い症例とあった。これにより、強陽性群、中等度陽性群、弱陽性群、の3種に大別された (Fig. 7~10)。

8) ConA-PO-DAB-PA-AP-FBK 反応によると正常前立腺例、前立腺肥大症では間質が黒紫色に染まり、とくに基底膜が濃染した。また腺上皮は顆粒状に褐色に染まった。これに対して前立腺癌組織では間質、癌細胞とも褐色に、あるいは間質がごく軽度に紫褐色に染色されるのみであった (Fig. 17, 18)。

9) PO-RCA-DAB 反応は、正常前立腺例、肥大症では間質、上皮細胞とも、反応陽性で染色性はほぼ同様であったが、核は反応陰性であった。癌組織では間質の染色性が肥大症より強いが、癌症例間の差はほとんどみられなかった。癌細胞核は反応陰性であった。癌細胞質の反応性は、ConA-PO-DAB 染色と同様に強染する症例、やや強い症例、弱い症例と、各症例間の染色性の差が大きく、強陽性群、中等度陽性群、弱陽性群の3種に大別された (Fig. 12~16)。

タンパク検出用染色では正常前立腺例、肥大症、前立腺癌とも反応は陽性であり、染色性の差はほとんどみられなかった。

a) TZ 反応は正常、肥大症、癌組織とも、強く染色されたがとくに細胞核、間質の染色性が強く、とくに平滑筋が強陽性であった。

b) RSR 反応は主として正常、肥大症、癌組織とも細胞核が強陽性であり、細胞質、間質はともに弱陽性であった。

c) NIN-S 反応は、正常、肥大症、癌組織とも間質と細胞核がおもに陽性反応をしめした。

d) D.D.D. ジアゾ青 B 反応では、正常、肥大症とも腺上皮細胞と平滑筋細胞が、癌組織では癌細胞と平滑筋細胞が強陽性であった。

e) PFA-AB 反応によると正常、肥大症では基底膜が濃染し間質がこれにつぎ上皮細胞の染色性は弱かった。癌組織では間質全体が濃染した。

PAP 検出用染色は正常、肥大症ともに腺上皮細胞のみが反応陽性であり、主として上皮細胞質の腺腔側に顆粒状の染色がみられ極性はよく保たれていた。癌組織も癌細胞のみに反応陽性であるが、染色された顆粒は細胞質中に一様に分散し極性は失われていた。癌では各症例ともほぼ同様の染色性をしめし、血中の PAP 値とは相関せず、また正常、肥大症と比較してもほぼ同様の染色性をしめした (Fig. 19~22)。

PO-RCA-DAB 染色により癌症例を強陽性、中等度陽性、弱陽性とに分類し、臨床と対比し以下の結果を得た。年齢別では、強陽性群は平均年齢74.5歳、中等度陽性群は71.8歳、弱陽性群は72.3歳と、ほぼ同様であった。分化度と比較すると、分化度の高さと染色性の強さに $P<0.1$ で相関がみられた (Table 6)。Stage と比較すると、Stage の低い症例に、染色性が強い傾向がみられた (Table 7)。高分化型でも骨転移以外の遠隔転移のある症例は弱陽性をしめし、中、低分化型においては、治療によく反応した症例は強陽性中等度陽性が多く、初診より2年以内に癌死した症例や、初診時に骨以外の遠隔転移を認めた症例は、すべて弱陽性であった。また、治療前に強陽性であり、治療後には弱陽性に变化した症例もあり、これらから PO-RCA-DAB の染色性は、ある程度、臨床経過を反映しているものと思われた。

ConA-PO-DAB 反応においては、平均年齢別では強陽性群75.4歳、中等度陽性群72.9歳、弱陽性群72.2歳でありほぼ同様であった。染色性と分化度とはやや相関するようだが (Table 8)、Stage 分類とは相関しなかった (Table 9)。しかし血中の PAP 値と比較すると (Table 10)、PAP 値は ConA-PO-DAB 反応強陽性群では $m \pm SD$ (平均 \pm 標準偏差) $=219.5 \pm 495.3$ ng/ml、中等度陽性群では $m \pm SD=248.3 \pm 280.9$ ng/ml、弱陽性群では $m \pm SD=5.66 \pm 6.6$ ng/ml であり、ConA-PO-DAB 染色の染色性と、血中の PAP 値と相関した。これに対して PO-RCA-DAB 染色と血中の PAP 値を比較したが (Table 11) これは相関しなかった。血中のアルカリフォスファターゼ (以下 Alp と略す) 値と、ConA-PO-DAB 染色の染色性や、PO-RCA-DAB の染色性と比較すると (Table 12, 13.), Alp が極端な高値をしめしても弱陽性である症例が多く、ConA-PO-DAB の染色性と血中の Alp 値とやや相関すると思われるが、PO-RCA-DAB の染色性と、血中の Alp 値とは相関しなかった。

検定はすべて χ^2 検定でおこなった。

Table 9. ConA-PO-DAB 染色と前立腺癌の Stage との関係をしめす

	強陽性	中等度陽性	弱陽性	
Stage A	1	0	1	
B	1	0	3	
C	0	2	4	
D	5	6	17	

$$\chi^2=3.380 \quad p=0.7586$$

Table 10. ConA-PO-DAB 染色と前立腺癌の 血中 PAP 値との関係をしめす

	強陽性	中等度陽性	弱陽性	計
高度上昇	2	5	0	7
軽度上昇	3	1	6	10
上昇なし	2	3	18	23
計	7	9	24	40

$$\chi^2=16.936 \quad p=0.002$$

高度上昇: PAP値30ng/ml以上

軽度上昇: PAP値5ng/ml以上30ng/ml未満

上昇なし: PAP値5ng/ml未満

Table 11. PO-RCA-DAB 染色と前立腺癌の 血中 PAP 値との関係をしめす

	強陽性	中等度陽性	弱陽性	計
高度上昇	1	2	4	7
軽度上昇	3	4	3	10
上昇なし	4	7	12	23
計	8	13	19	40

$$\chi^2=1.996 \quad p=0.735$$

高度上昇: PAP値30ng/ml以上

軽度上昇: PAP値5ng/ml以上30ng/ml未満

上昇なし: PAP値5ng/ml未満

Table 12. ConA-PO-DAB 染色と前立腺癌の 血中 Alp 値との関係をしめす

	強陽性	中等度陽性	弱陽性	計
高度上昇	1	2	4	7
軽度上昇	1	4	4	9
上昇なし	5	2	15	22
計	7	8	23	38

$$\chi^2=6.315 \quad p=0.1792$$

高度上昇: Alp値300IU/L以上

軽度上昇: Alp値115IU/L以上300IU/L未満

上昇なし: Alp値115IU/L未満

考 察

分子内に糖を共有結合でもつ生体高分子を一括して複合糖質といい、さらにムコ多糖、糖タンパク、糖脂質とに3大別される¹⁾。

ムコ多糖は、脂質を含まない多糖であり、そのほとんどすべては分子中にカルボキシル基や硫酸エステル

Table 13. PO-RCA-DAB 染色と前立腺癌の 血中 Alp 値との関係をしめす

	強陽性	中等度陽性	弱陽性	計
高度上昇	2	2	3	7
軽度上昇	0	4	5	9
上昇なし	6	6	10	22
計	8	12	18	38

$$\chi^2=3.382 \quad p=0.515$$

高度上昇: Alp値300IU/L以上

軽度上昇: Alp値115IU/L以上300IU/L未満

上昇なし: Alp値115IU/L未満

などの酸性基を含み酸性ムコ多糖と呼ばれる。またこれらのムコ多糖はその構成単糖や、そのほかの構成成分たとえば硫酸基、カルボキシル基により、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸異性体A、B、C、D、Eなどに分類され、命名されている。一般にムコ多糖は生体において、蛋白、ペプチドなどと結合した、複合体として分布し、さまざまな生理学的機能を果している¹⁴⁾。

ムコ多糖は動物体を構成する諸組織のうち、結合組織、軟骨組織、骨組織など支持組織の主要成分をなす物質である。また上皮、筋、神経などの組織にも必ず若干量含まれている。結合組織は、細胞成分、線維成分、基質からなるが、ムコ多糖は基質と密接に関係する。顕微鏡で観察すると、基質は結合組織細胞と線維との間を埋めているゲル状、または流動性の物質で、光学的に均一透明である。通常の固定、染色法ではかなりの量が操作中に溶出、消失するので、ムコ多糖の固定には四級アンモニウム塩である、CPC が用いられる³²⁾。

前立腺肥大症、前立腺癌、正常前立腺ともアルシアン青染色に陽性反応をしめし、酸性ムコ多糖および糖タンパクが間質、上皮細胞、癌細胞のいずれにも存在する。

前立腺肥大症においては、アルシアン青 (pH 1.0) 染色にて、間質、基底膜には硫酸ムコ糖が存在し、コンドロイチナーゼ ABC により染色性を失い、睪丸ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ AC にては失なわないことより、この間質、基底膜には、コンドロイチン硫酸 B が有意に存在する。しかし上皮細胞中に、有意には硫酸ムコ糖が検出されることはなかった。アルシアン青 (pH 2.5) 染色では上皮細胞は濃染し、睪丸ヒアルロニダーゼ、放線菌ヒアルロニダーゼの消化効果の差より、弱酸性ムコ糖、すなわちコンドロイチン、ヒアルロン酸などが相当量存在すると思われる。また間質のアルシアン青 (pH 2.5) の染色性は

アルシアン青 (pH 1.0) よりも強く、同様にコンドロイチン、ヒアルロン酸などが存在する。いっぽう、シアリダーゼの消化効果は弱く、間質、腺上皮細胞ともにシアリ酸は有意に検出されなかった。

前立腺癌においては、アルシアン青 (pH 1.0) 染色によると間質、癌細胞ともに肥大症より染色性が強く硫酸ムコ多糖は肥大症に比較して有意に増加しているとおもわれる。さらにアルシアン青 (pH 1.0) 染色に対する、コンドロイチナーゼ ABC, AC および、睾丸ヒアルロニダーゼの消化効果がほぼ同程度であることから、間質に増加している硫酸ムコ多糖はおもにコンドロイチン硫酸 A, C であろう。アルシアン青 (pH 2.5) 染色による癌細胞の染色性は強く、また放線菌ヒアルロニダーゼの効果に比し睾丸ヒアルロニダーゼの消化効果の大きいことから、癌細胞中にはおもに弱酸性ムコ多糖 (コンドロイチン、ヒアルロン酸など) が多量に存在すると思われる。また癌細胞中ではシアリ酸が検出された。

基底膜は正常前立腺、肥大症ともに腺上皮細胞基底部の PAS 染色陽性の膜様構造として観察される。基底膜はコラーゲン性糖蛋白、非コラーゲン性糖蛋白および酸性ムコ多糖より成るが³⁹⁾、アルシアン青 (pH 1.0) 染色により正常例、肥大症例とも、基底膜が間質のほかの部位よりも強く染色され、消化実験の結果をもあわせると、同部にはコンドロイチン硫酸 B が相当量存在すると思われる。これは間質のほかの部位よりも、量的に多いと推定される。またアルシアン青 (pH 2.5) 染色にても基底膜は反応陽性であり、睾丸ヒアルロニダーゼ、および放線菌ヒアルロニダーゼの消化効果も著明であり、同部にはヒアルロン酸も相当に存在する。これに反して癌組織においては、PAS 染色にても高分化型の一部を除き、明瞭な基底膜は観察できず、またアルシアン青 (pH 1.0) 染色によっても硫酸ムコ多糖性の膜様構造の存在は確認されなかった。

α -アミラーゼ消化試験によると、正常前立腺、肥大症ともに腺上皮細胞中にはグリコーゲン顆粒が存在する。これに反し癌細胞中にはグリコーゲンはほとんど存在しなかった。

以上をまとめると、前立腺肥大症、癌組織に分布する酸性ムコ多糖の差異は、つぎのごとくである。

癌間質には硫酸ムコ多糖ことにコンドロイチン硫酸 A, C, と弱酸性ムコ多糖、すなわちコンドロイチンヒアルロン酸が存在する。癌細胞にも同様に硫酸ムコ多糖と、弱酸性ムコ多糖すなわちヒアルロン酸などが存在するが、分布には差異があり、癌間質には硫酸ム

コ多糖がより多く、癌細胞中には弱酸性ムコ多糖がより多く存在する。

前立腺肥大症の間質には、癌間質とは異なり、コンドロイチン硫酸 B, 弱酸性ムコ多糖 (ヒアルロン酸、コンドロイチンなど) が存在するが、その量は少ない。

前立腺肥大症の腺上皮細胞には、硫酸ムコ多糖は有意には認められず、弱酸性ムコ多糖 (ヒアルロン酸、コンドロイチンなど) が存在する。正常前立腺は腺上皮細胞、間質とも、肥大症とはほぼ同様の結果であった。

基底膜には正常前立腺、肥大症ともにコンドロイチン硫酸 B, ヒアルロン酸などが存在する。癌組織では高分化型では一部で基底膜が観察されたが、中分化型、低分化型では光顕的に基底膜があきらかでなかった。これに関して鈴木は、癌細胞では合成されるヒアルロン酸が、基底膜の形成を阻害すると報告している³⁴⁾。

上皮性腫瘍組織において酸性ムコ多糖が増加しているとの報告は多く、西田らは胃腺癌においてコンドロイチン硫酸 A, C, ヒアルロン酸が増加するが、シアリ酸は検出されないと報告している³⁵⁾。そのほか、結合組織性腫瘍³⁶⁾、乳癌³⁷⁾、などでも同様の報告がある。本研究においてもこれらの報告とはほぼ同様の結果がえられた。

間質の酸性ムコ多糖の増加は、腫瘍細胞によるムコ多糖の産生⁷⁾や分解、腫瘍細胞に反応した間葉系細胞によるムコ多糖の産生³⁸⁾、あるいは間質、結合組織反応による炎症性細胞浸出³⁹⁾など、さまざまな原因があげられるが、今回の実験結果では正常前立腺や肥大症の上皮細胞には認められないコンドロイチン硫酸 A, C が癌細胞中に検出され、またヒアルロン酸なども癌細胞にも癌間質にも増加しており、癌細胞によるこれらムコ多糖の産生を、示唆しているものと考えられる。

この酸性ムコ多糖が腫瘍組織中に増加する意義について、Ozzello らはヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸が腫瘍細胞の増殖に不可欠であるとし⁴⁰⁾、竹内らは、移植腫瘍の増殖を酸性ムコ多糖が支持するとし、さらに上皮性腫瘍細胞が旺盛な増殖をしめすときは著明に酸性ムコ多糖が合成され活性をしめし、腫瘍に特有な間質組織を形成してゆくと報告している⁴¹⁾。Bernfield らは発生過程の増殖中の上皮細胞ではムコ多糖が合成され間質にも多量のムコ多糖が存在すると報告している⁴²⁾。さらに Toole らは癌組織の増殖、侵入部位にはヒアルロン酸が多量に認められ、ヒアルロン酸が癌の浸潤、増殖に重要な役割を果たしている⁴³⁾。鈴木も癌細胞表面のヒアルロン酸が癌細胞の浸潤、転移と密接な関係があると述べている³⁴⁾。したがって前立腺癌細胞中でも、酸性ムコ多糖が合成され、その増殖、

浸潤、転移と同物質の存在が不可欠であろうと推測される。また酸性ムコ多糖は前立腺組織の亜鉛と結合することが知られており⁴⁴⁾、この面からの酸性ムコ多糖の前立腺代謝との関連も検討されるべきであろう。

本研究において、酸性ムコ多糖の増加は高分化型癌においても顕著にみられるので、アルシアン青染色が前立腺癌と肥大症の組織診断に役立つものと考えられ本染色の臨床応用が期待される。

糖タンパクはコアとなるタンパク質にヘテロの短い小糖鎖が共有結合したもので、糖タンパク1分子あたりの糖鎖の量は一定せず、ムコ多糖にみられるような二糖単位のくり返しはない。糖鎖に含まれる糖残基のおもなものには、ガラクトサミン、グルコサミン、ガラクトース、グルコース、マンノース、フコース、シアル酸などがある⁴⁵⁾。

一般に糖タンパクの分布は実に多彩であり、すべての細胞に含まれ、タンパクを合成するすべての細胞によって産生され細胞成分をなしたり、間質結合組織中にも含まれ、あるいは細胞外に分泌される。分泌される糖タンパクには、諸種ホルモン、酸性フォスファターゼ、その他がある。他方細胞成分としては、細胞膜の構成成分として、細胞内膜系、形質膜などすべての膜構造に含まれる。また間質結合組織中には、コラーゲン、エラスチンなどの線維成分のほか、基質中に無定形物質としても存在⁴⁶⁾する。今回の実験によりこれらの細胞膜中の糖残基と特異的に結合するレクチンである Concanavalin A, Ricinus communis agglutinin などを使用して前立腺上皮細胞膜中の糖タンパクの糖残基を同定した。さらに PAS 反応によって糖タンパクの 1,2-glycol 基を検出した。1,2-glycol 基と糖残基との関係を見るためには lectin-PO-DAB 反応と、1,2-glycol 基検出とを組合せる二重染色が利用される²²⁾。

正常前立腺、肥大症、前立腺癌、各組織とも 1,2-glycol 基は上皮細胞、癌細胞、間質で検出された。細胞内では正常前立腺、肥大症、前立腺癌各細胞で差はほとんどなかった。

間質では、癌において、正常例、肥大症例に比し、 α -D-mannose、 α -D-glucose 残基、および β -D-galactose 残基をもつ糖タンパクの増加が認められた。これに対して、1,2-glycol 基をもつ糖タンパクは正常例、肥大症間質で、癌間質よりも比較的多量に認められた。この傾向は癌細胞の分化度にも相関し、とくに高分化型よりも低分化型で顕著であった。

細胞では、PO-RCA-DAB 染色、ConA-PO-DAB 染色において、正常前立腺、および前立腺肥大症では

症例間の染色性の差異はなく、 α -D-mannose、 α -D-glucose、 β -D-galactose 残基をもつ糖タンパクの分布、局在に差はないと思われる。これにたいして、癌ではその染色性が各症例間であきらかに差があり、濃染するものを強陽性例、それよりもやや染色性の弱いものを中等度陽性例、ほとんど染色しなかった症例を弱陽性例と分類することができた。このことは、PO-RCA-DAB 染色において、ConA-PO-DAB 染色よりも顕著であった。

前立腺癌細胞における、PO-RCA-DAB 染色や ConA-PO-DAB 染色の染色性の相異は、癌細胞中のレクチンレセプター、すなわち糖タンパク中の糖残基である α -D-mannose、 α -D-glucose、 β -D-galactose 残基の多寡によるものと思われる。強陽性症例では、これらの糖残基を含む糖タンパクの増加をしめし、弱陽性例よりも、癌細胞中での糖タンパクが増加しているものとおもわれる。正常細胞と比較して、癌細胞のレクチンレセプターの増加は数多く報告されており、その原因は癌化にともなう細胞膜構造の変化、すなわち、Burger の cryptic site hypothesis⁴⁷⁾、レセプターの密集化、レセプターの再配列など^{48,49)} が考えられている。しかし現在まで前立腺癌中での、レクチンレセプターの報告はほとんどみられない。

前立腺癌の PO-RCA-DAB の染色性の差は臨床での Stage、および分化度と相関する傾向をしめした。糖タンパクは細胞膜の構成成分として、すべての膜構造に含まれているが、膜に含まれる糖タンパクには、ホルモンレセプター⁵⁰⁾、各種酵素⁵¹⁾、あるいはフィブロンネクチンのごとく細胞の接着、分化、間質線維の形成構築維持などを果すもの⁵²⁾と数多くある。 β -D-galactose 残基を持つ糖タンパクの同定はまだ不十分であり、それを特定することは不可能であるが、 β -D-galactose 残基を持つ糖タンパクの個々の癌症例による差をしめしている可能性もあるとおもわれる。酸化酵素、転移酵素、加水分解酵素で糖タンパクに分類される酵素は数多く存在する⁵¹⁾。なかでも糖タンパク合成に関する、糖転移酵素はゴルジ装置ばかりか細胞表面にも存在し、細胞の接着、増殖の調節、などの面からも注目されているが⁵³⁾、そのうち galactosyltransferase は乳癌などで増加するとの報告があるので⁵⁴⁾、転移酵素と PO-RCA-DAB 染色との関連も考えられる。電顕的には RCA の結合部位は固定した組織では形質膜、ゴルジ膜、多胞体とされており^{55,56)}、そのなかでもゴルジ装置は糖タンパクの合成において、糖タンパクがライボソームや、粗面小胞体でつくられたのち、ガラクトースをゴルジ装置で付加

されて成熟することから^{57,58)}、その関連性が注目されている。正常前立腺細胞や肥大症細胞ではゴルジ装置は原則として核の近くで腺腔側にひとつ存在する⁵⁹⁾。癌細胞においてはこのような極性は消失するが、一般に高分化型ではよく発達し、低分化型では小型であるとされ、かつ数は一定していないとされている⁶⁰⁾。それゆえ PO-RCA-DAB 染色の染色性の相異は癌細胞での、膜構造中の糖タンパクの変化や、癌細胞でのゴルジ装置の数や機能などが、原因のひとつであると推定される。さらにフィブロネクチンは癌化した細胞表面では消失するとの報告もあり⁶¹⁾、このような細胞接着、分化などの機能をもつ糖タンパクの変化もひとつの原因とおもわれる。また臨床的にも治療のよく奏効した症例に PO-RCA-DAB 染色の強陽性症例が多く、さらに治療によって染色性が変化するらしく、したがって PO-RCA-DAB 染色はある程度、癌細胞のアンドロゲンホルモンレセプターや諸酵素の変化、細胞の接着、分化さらに浸潤、転移にも関連するのではないかと考えられる。それゆえこれが新たな前立腺癌の分類の基準になるものと期待される。

ConA-PO-DAB における染色性の差は α -D-mannose, α -D-glucose 残基を含む糖タンパクの差異をしめす。また ConA と PAP とは親和性があり⁶²⁾、同一症例で、治療前は血中の PAP 値が高値であり、ConA-PO-DAB 反応が強陽性をしめしていたが、それが治療後血中の PAP 値が低下するとともに弱陽性になった症例があったので、細胞中の PAP 量を反映するものと思われ、ConA-PO-DAB 染色は前立腺癌の糖タンパク合成の程度をある程度しめしていると考えている。事実 ConA 結合部位の電顕的検討によると、ConA は形質膜、小胞体、ゴルジ膜、核膜などに結合し^{63,64)}、糖タンパクの合成では粗面小胞体でマンノース付加がおこなわれている、という報告もあり⁶⁷⁾、また去勢ラットでは正常ラットに比較して、ConA-HRP 染色の染色性が弱いとの報告⁶⁵⁾や、前述の糖タンパク合成に関与する糖転移酵素のひとつである、galactosyltransferase に ConA が結合するとの報告⁶⁶⁾などから十分考えられる。

PAP, ALP ばかりか、前立腺癌には Pontes らの総説のように⁶⁶⁾、腫瘍マーカーは数多く、ConA-PO-DAB 染色、RCA-PO-DAB 染色との関連も示唆される。

PAP 検出用染色によると、肥大症と癌とでは染色性が異なり、癌の分化度と染色性との相関がみられるとの報告もあるが⁶⁷⁾、今回の実験結果は Bentz の報告⁶⁸⁾と同様に正常前立腺、肥大症、前立腺癌症例間、

および癌の分化度別の染色性にもほとんど差異がみられなかった。PAP 検出用染色と ConA-PO-DAB 染色の結果によると、血中の PAP 値の大きなばらつきは、癌細胞の産生能、分泌能、血中へのバリアーの存在、ネガティブフィードバックの存在、癌細胞と間質との構成比などがあげられているが^{69,70)}、今回の実験結果から、癌細胞中の糖タンパク合成の程度に相異が認められるので、ある程度癌細胞中の PAP 合成と関係があることが推定される。

タンパク染色の結果では、癌と肥大症間のタンパクアミノ酸の分布の差はあきらかでなかったが、肥大症の光顕的な基底膜が PFA-AB 反応に反応陽性であり、これは SS 基の存在をしめし、この基を持つアミノ酸はチスチンであり同部位にはチスチンが相当量存在すると思われる。また SH 基検出のための RSR, D,D,D. 反応では癌、肥大症とも間質に比し、細胞ごとに核の反応が陽性であり、SH 基をもつアミノ酸すなわちチスチン、グルタチオン、およびメチオニンが細胞ごとに核に相当量存在することも推測される。

結 語

前立腺肥大症と前立腺癌組織との組織化学的相異をあきらかにする目的で、正常前立腺 8 例、肥大症 27 例前立腺癌 40 例の組織を、1% CPC-10% ホルマリン液にて固定し、パラフィン切片とし、複合糖質染色、タンパク検出用染色、PAP 検出用染色、血中の PAP 値測定などをおこない、以下の結果をえた。

- 1) 癌間質には、硫酸ムコ多糖とくにコンドロイチン硫酸 A, C, および弱酸性ムコ多糖、とりわけヒアルロン酸が存在した。
- 2) 癌細胞にも同様に硫酸ムコ糖や、弱酸性ムコ多糖ことにヒアルロン酸、さらにシアル酸が存在した。癌間質と細胞でのムコ多糖の分布の差は間質には硫酸ムコ糖がより多く、細胞には弱酸性ムコ多糖がより多く存在した。
- 3) 前立腺肥大症の間質には、癌間質とは異なり、コンドロイチン硫酸 B や、弱酸性ムコ多糖ことにヒアルロン酸が存在するが、その量は少なかった。
- 4) 前立腺肥大症の腺上皮細胞には、硫酸ムコ多糖は認められず、弱酸性ムコ多糖ことにヒアルロン酸が存在した。正常前立腺は肥大症とほぼ同様の結果であった。
- 5) 正常前立腺、肥大症の基底膜にはコンドロイチン硫酸 B, ヒアルロン酸などが存在した。癌組織で、低分化型ほど基底膜はあきらかではなかった。

6) 癌間質には正常前立腺、肥大型に比較して 1,2-glycol 基を持つ糖タンパクは減少していた。

7) 正常前立腺、肥大型では腺上皮細胞中の β -D-galactose 残基あるいは α -D-glucose, α -D-mannose 残基を持つ糖タンパクの分布は、全症例間でほぼ同様であった。

8) 癌細胞中の β -D-galactose 残基を含む糖タンパクの分布には、各症例間で差があり、PO-RCA-DAB 染色の染色性により三大別が可能であった。この染色性と臨床経過との間に相関が認められた。

9) 癌細胞中の α -D-glucose, α -D-mannose 残基を含む糖タンパクの分布には各症例間で差があり、ConA-PO-DAB 染色の染色性により三大別が可能であった。ConA-PO-DAB 染色性と、血中の前立腺性酸フォスファターゼ値との間に相関がみられた。

10) 正常前立腺と肥大型の前立腺性酸フォスファターゼは細胞内で極性を示して存在した。

11) 癌細胞中の前立腺性酸フォスファターゼの存在は極性を失っていたが、肥大型とほぼ同様に染色された。

12) 血中の前立腺性酸フォスファターゼ値と癌細胞内の前立腺性酸フォスファターゼの染色性とはかならずしも相関しなかった。

以上の結果より前立腺肥大型と癌組織における、複合糖質の組織化学的相異や、癌の分化度などによる複合糖質の分布の差がしめされ、これらはあわせて臨床面への応用が可能であることを示唆している。

稿を終るに臨み、本論文の御指導、御校閲を賜りました三矢英輔教授に心からの謝意を表します。また種々の御協力、御教示をいただいた三宅弘治助教授、名古屋市立大学医学部第2解剖学教室山田和順教授に深く感謝いたします。ならびに種々の御協力をいただいた教職員諸兄に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第72回日本泌尿器科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) 平野茂博：緒論、ムコ多糖の構造と機能、長谷川栄一、2版、1～5、南江堂、東京、1976
- 2) 板倉照好：癌細胞間相互作用の異常。代謝 21: 353～360, 1984
- 3) 田口 修：泌尿生殖器の発生分化、異常増殖における間質の役割。癌と化学療法 11: 670～675, 1984
- 4) Chung LWK and Cunha GR. Stromal-epithelial interactions: II. Regulation of prostatic growth by embryonic urogenital sinus mesenchyme. The prostate 4: 503～511, 1983
- 5) Muntzing J: Collagen synthesis and breakdown in the rat ventral prostate, The prostatic cell: structure and function. part A, G P Murphy, A A Sandberg, J P Karr, 137～144, Alan R Liss, Inc, N.Y. 1981
- 6) Liota LA: Tumor extracellular matrix. Lab Invest 47: 112～113, 1982
- 7) 馬場志郎・早川正道・中沢和子・中村 宏・藤岡俊夫・小田島邦男：尿路悪性腫瘍患者の尿中酸性ムコ多糖体排泄量とその組成分布。日泌尿会誌 74: 39～54, 1983
- 8) 大平敦彦：細胞表層に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの構造と機能。代謝 21: 305～313, 1984
- 9) 糸井壮三：泌尿器科領域における酵素の研究。第2報。日泌尿会誌 50: 597～620, 1959
- 10) 杉山寿一・日江井鉄彦・加藤範夫・三矢英輔・野口英三・仙田宏平・佐々木常雄：RIA 法における血清中の前立腺性酸性ホスファターゼの検討。泌尿紀要 27: 1415～1425, 1981
- 11) McManus JFA: Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technol 23: 99～108, 1948
- 12) Lillie RD and Fullmer HM Glycogen demonstration methods, Histopathologic technic and practical histochemistry. 4th. 626～632, McGraw-Hill Book Co. New York, 1976
- 13) Lev R and Spicer SS: Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. J Histochem Cytochem 12: 309, 1964
- 14) Pearse AGE: Phthalocyanin dyes, Alcian blue. Histochemistry. Theoretical and applied. Vol. 1. 344～349, Churchill Ltd., London & N.Y., 1968
- 15) 山田和順：ムコ糖の組織細胞化学的研究法、蛋白質 核酸 酵素, 17: 775～790, 1972
- 16) Spicer SS, Horn RG and Leppi TJ: Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. The connective tissue. 251～303, Baltimore. Williams Wilkins Company, 1967
- 17) Yamada K: The effect of digestion with Streptomyces hyaluronidase upon certain histochemical reactions of hyaluronic acid

- 1) 平野茂博：緒論、ムコ多糖の構造と機能、長谷川栄一、2版、1～5、南江堂、東京、1976
- 2) 板倉照好：癌細胞間相互作用の異常。代謝 21: 353～360, 1984
- 3) 田口 修：泌尿生殖器の発生分化、異常増殖における間質の役割。癌と化学療法 11: 670～675, 1984
- 4) Chung LWK and Cunha GR. Stromal-epithelial interactions: II. Regulation of prostatic growth by embryonic urogenital

- containing tissues. *J Histochem Cytochem* 21: 794~803, 1973
- 18) Leppi TJ and Stoward PJ: On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue sections. *J Histochem Cytochem* 13: 406~407, 1965
- 19) Yamada K: Histochemical and cytochemical method for study of mucosaccharides. *Protein Nucleic Acid Enzyme* 17: 775~790, 1972
- 20) Yamada K: The effect of digestion with chondroitinases upon certain histochemical reactions of mucosaccharidecontaining tissues. *J Histochem Cytochem* 22: 266~275, 1974
- 21) Yamada K and Shimizu S: Concanavalin A-peroxidase-diaminobenzidine (Con A-PO-DAB)-alcian blue (AB). A reliable method for dual staining of complex carbohydrates. *Histochemistry* 47: 159~169, 1976
- 22) Yamada K: Concanavalin A-peroxidase-diaminobenzidine-periodic acid-m-aminophenol-fast black salt K.: A method for the dual staining of neutral complex carbohydrate. *Histochem J* 10: 573~584, 1978
- 23) 清水 暁・山田和順: Lectin-Peroxidase-Diaminobenzidine (LT-PO-DAB) 反応を使用する結合組織複合糖質の二重染色法. *結合組織* 10: 57~67, 1978
- 24) Yamada K and Shimizu S: The histochemistry of galactose residues of complex carbohydrate as studied by peroxidase-labelled *Ricinus communis* agglutinin. *Histochemistry* 53: 143~156, 1977
- 25) Pearse AGE: *Histochemistry, theoretical and applied*. Vol. 1. 127~129, Churchill Livingstone, Edinburgh London and New York, 1968
- 26) Bennet HS and Watts RM: The cytochemical demonstration and measurement of sulfhydryl groups by azo-aryl mercaptide coupling, with special reference to mercury orange. *General cytochemical method*. Danielli JF, 317~374, Academic Press, New York, 1958
- 27) Yasuma A and Ichikawa T: Ninhydrin and alloxan-shiff staining. A new histochemical staining method for protein. *J Lab Clin Med* 41: 296~299, 1953
- 28) Adams CWM and Sloper JC: Technique for demonstrating neurosecretory material in the human hypothalamus. *Lancet* I: 651~652, 1955
- 29) Barnett RJ and Seligman AM: Histochemical demonstration of sulphydryl and disulfide groups of protein. *J Nat Cancer Inst* 11: 769~792, 1954
- 30) 渡辺慶一・名倉 宏・長村義之・小松遵至・和泉伸一・吉村真一・武市光司: 酵素抗体染色法の手技, 酵素抗体法, 渡辺慶一, 1版, 33~99, 学際企画, 東京, 1981
- 31) 瀬戸輝一・矢谷隆一・原田昌興・古里征國・坂本穆彦・菅野晴夫: 「前立腺癌の組織分類と取扱い規約」試案の概要. *日病会誌* 72 補冊(2): 22~27, 1983
- 32) Kelly JW, Bloom GD and Scott JE: Quaternary ammonium compounds in connective tissue histochemistry: I. selective unblocking. *J Histochem Cytochem* 11: 791~798, 1963
- 33) Risteli L and Risteli J: Basement membrane research. *Medical Biology* 59: 189~189, 1981
- 34) 鈴木 旺: 癌細胞の転移過程における細胞基質間相互作用. *癌と化学療法* 11: 677~680, 1984
- 35) 西田清一・渡辺洋望・小林 晃・大高裕一: 癌固有間質及び偶然間質の組織化学的観察. *結合組織* 5: 41~42, 1973
- 36) 三沢和男・渡辺洋望・大高裕一: 結合組織の腫瘍及び増殖性変化についての組織化学. *結合組織* 4: 74~75, 1972
- 37) 竹内 純・祖父江三津子・佐藤恵美子・三浦 馥・中垣茂男: 乳腺腫瘍組織の間質結合組織に関する生化学的ならびに組織学的研究. *結合組織* 8: 47~56, 1976
- 38) 竹内 純・祖父江三津子・吉田正彦・中島伸夫・築館一男・内堀典保・辻 克人・稲垣喜治・岡田雅昭: 腫瘍間質成分の特性とその組織構築との相関. *結合組織* 14: 47~51, 1982
- 39) 渡辺洋望: 炎症における結合組織の動態. *結合組織* 4: 13~16, 1972
- 40) Ozzello L, Lasfargues EY and Murray M: Growth-promoting activity of acid mucopolysaccharides on a strain of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 20: 600~605,

- 1960
- 41) Takeuchi J : Growth-promoting effect of acid mucopolysaccharides on Ehrlich ascites tumor. *Cancer Research* **26**: 797~802, 1966
- 42) Bernfield MR and Banerjee SH : Acid mucopolysaccharid (glycosaminoglycan) at the epithelial-mesenchymal interface of mouse embryo salivary glands. *J Cell Biol* **52**: 664~673, 1972
- 43) Toole BP, Biswas C and Gross J: Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Biochemistry* **76**: 6299~6303, 1979
- 44) Sato CS and Gyorkey F: Zinc binding by glycosaminoglycans. *J Biochem* **80**: 883~886, 1976
- 45) 吉沢善作・伊勢村 護・池中徳治・木幡 陽・村松 剛: 構造, 糖タンパク質の構造と機能 I, 吉沢善作, 山科郁男, 1版, 13~33, 南江堂, 東京 1978
- 46) Spiro RG: Glycoprotein: Their biochemistry, biology, and role in human disease. *N Engl J Med* **281**: 1043~1056, 1969
- 47) Burger MM: A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells. *Proc NAS* **62**: 994~1001, 1969
- 48) Rapin AMC and Burger MM: Tumor cell surfaces : general alterations detected by agglutinins. *Adv Cancer Res* **20**: 1~42, 1974
- 49) Emmelot P: Biochemical properties of normal and neoplastic cell surfaces; a review. *Europ J Cancer* **9**: 319~333, 1973
- 50) 井村裕夫: ホルモン・レセプター. *臨泌* **33**: 731~280, 1977
- 51) Juitsz M and Llosa P: Section I. Glycoproteins as Hormones and as Enzymes, Glycoproteins, Gottschalk A. part B, 1019~1068, Elsevier Publishing Co. Amsterdam, 1972
- 52) Ruoslahti E and Engvall E: Complexing of fibronectin glycosaminoglycans and collagen. *Biochemica et Biophysica Acta* **631**: 350~358, 1980
- 53) Shur BD and Roth S: Cell surface glycosyl-transferases. *Biochem Biophys Acta* **415** 473~512, 1975
- 54) Chatterjee SK and Kim U : Galactosyl-transferase activity in metastasizing and nonmetastasizing rat mammary carcinomas and its possible relationship with tumor cell surface antigen shedding. *J Natl Cancer Inst* **58**: 273~280, 1977
- 55) Yokoyama M, Nishiyama F, Kawai N and Hirano H: The staining of Golgi membranes with Ricinus communis agglutinin-horseradish peroxidase conjugate in mice tissue cells. *Exp Cell Res* **125**: 47~53, 1980
- 56) Bertton R and Bariety J : A comparative ultrastructural localization of Concanavalin A, wheat germ and Ricinus communis on glomeruli of normal rat kidney. *J Histochem Cytochem* **24**: 1093~1100, 1976
- 57) 斎藤多久馬・松下正也 . ゴルジ装置の細胞化学. 生体の化学 **31** (1): 12~21, 1980
- 58) 平野 寛・高田邦昭・川上速人・西山文朗: 免疫細胞化学的にみた細胞膜. *細胞* **14**: 126~134, 1982
- 59) Mao P, Nakao K and Angrist A: Human prostatic carcinoma: an electron microscope study. *Cancer Res* **26**: 955~973, 1966
- 60) 古里征国・山口 裕・川口信彦: 泌尿器科系疾患の微細構造の見方 (10). *臨泌* **36**: 925~931, 1982
- 61) Yamada KM: Immunological characterization of a major transformationsensitive fibroblast cell surface glycoprotein. *J Cell Biol* **78**: 520~541, 1978
- 62) Lee C, Wang MC, Murphy P and Chu TM: A solid-phase fluorescent immunoassay for human prostatic acid phosphatase. *Cancer Res* **38**: 2871~2878, 1978
- 63) 東海林文夫: ラット前立腺上皮細胞のホスファターゼ活性局在とレクチン結合部位とに関する電顕的細胞化学的研究. *日泌尿会誌* **75**: 65~80, 1984
- 64) Bernhard W and Avrameas S: Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. *Exptl Cell Res* **64**: 232~236, 1971
- 65) Podolsky DK and Weiser MM: Role of cell membrane galactosyltransferase in concanavalin A agglutination of erythrocytes. *Bio-*

- chem J **146**: 213~221, 1975
- 66) Pontes JE: Biological markers in prostate cancer. J Urol **130**: 1037~1047, 1983
- 67) 吉田正林・三木 誠：前立腺の酸フォスファターゼに関する免疫組織化学的研究. 日泌尿会誌 **74**: 514~522, 1983
- 68) Bentz MS, Cohen C, Demers LM and Budgeon LR : Immunohistochemical acid phosphatase level and tumor grade in prostatic carcinoma. Arch Pathol Lab Med **106**: 476~480, 1982
- 69) Reif AE, Schlessinger RM, Fish CA and Robinson CM: Acid phosphatase isozymes in cancer of the prostate. Cancer **31**: 689~699, 1973
- 70) 石部知行・碓井 亜・田中求兵：酸性フォスファターゼアイソエンザイム. 日本臨床 **34**: 753~767, 1976
- (1984年8月2日迅速掲載受付)